

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, A61K 48/00, C07K 14/50, C12N 15/12		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/26409 (43) Date de publication internationale: 5 octobre 1995 (05.10.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00374 (22) Date de dépôt international: 24 mars 1995 (24.03.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/03682 29 mars 1994 (29.03.94) FR		(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG).	
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ABITBOL, Marc [FR/FR]; 184, avenue d'Italie, F-75013 Paris (FR). MALLET, Jacques [FR/FR]; 18, rue Charcot, F-75013 Paris (FR). PERRICAUDET, Michel [FR/FR]; 31, rue de Chartres, F-28320 Ecrosnes (FR). REVAH, Frédéric [FR/FR]; 49, rue de Châtenay, Bâtiment Flandre 2, F-92160 Antony (FR). ROUSTAN, Paul [FR/FR]; 32, résidence Courdimanche, F-91940 Les Ulis (FR). VIGNE, Emmanuelle [FR/FR]; 60, rue Jean-Le-Galleu, F-94200 Ivry-sur-Seine (FR). (74) Mandataire: LE COUPANEC, Pascale; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, Avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).		Publiée Avec rapport de recherche internationale.	

(54) Title: RECOMBINANT ADENOVIRUSES CODING FOR BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTORS (bFGF)

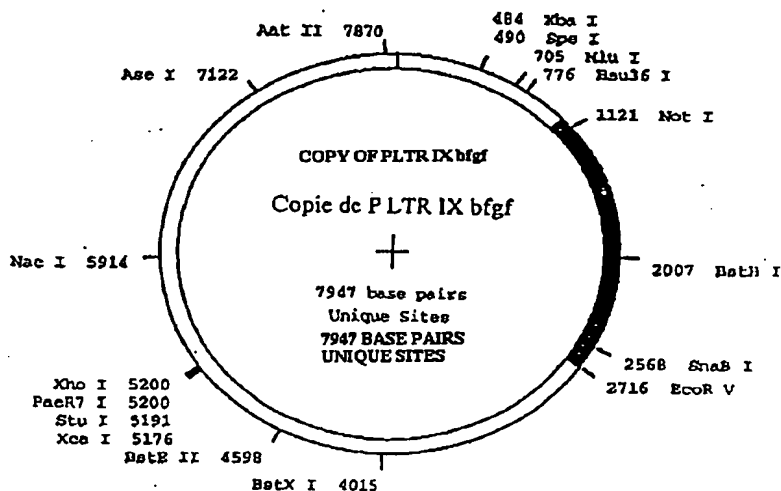
(54) Titre: ADENOVIRUS RECOMBINANTS CODANT POUR LES FACTEURS DE CROISSANCE DES FIBROBLASTES BASIQUES (bFGF)

(57) Abstract

Recombinant adenoviruses comprising a heterologous DNA sequence coding for basic fibroblast growth factors (bFGF), preparation and uses thereof for the treatment and/or prevention of neurodegenerative diseases.

(57) Abrégé

La présente invention concerne des adénovirus recombinants comportant une séquence d'ADN hétérologue codant pour les facteurs de croissance des fibroblastes basiques (bFGF), leur préparation, et leur utilisation pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives.



BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Bésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

ADENOVIRUS RECOMBINANTS CODANT POUR LES FACTEURS DE CROISSANCE DES
FIBROBLASTES BASIQUES (bFGF)

La présente invention concerne des adénovirus recombinants comportant une
séquence d'ADN codant pour les facteurs de croissance des fibroblastes basiques.
5 L'invention concerne également la préparation de ces vecteurs, les compositions
pharmaceutiques les contenant et leur utilisation thérapeutique, notamment en thérapie
génique pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives.

L'augmentation de la durée de vie dans les pays occidentaux s'accompagne
d'une croissance régulière des maladies neurodégénératives de type maladie
10 d'Alzheimer, maladie de Parkinson, chorée de Huntington, sclérose latérale
amyotrophique, etc. C'est ainsi que la maladie de Parkinson, par exemple, atteint
4% des personnes âgées de plus de 65 ans, et la maladie d'Alzheimer
atteint 10% des plus de 70 ans et 30% des plus de 80 ans. De manière
générale, toutes ces maladies résultent d'une perte progressive de cellules neuronales
15 dans le système nerveux central, voire au sein de structures très localisées comme dans
le cas de la maladie de Parkinson.

Au cours de ces dernières années de nombreuses recherches ont été
développées en vue de comprendre les mécanismes de ces dégénérescences liées aux
vieillessement pour mettre au point des moyens de traitement mais également des
20 moyens de prévention, par la thérapie génique.

Les facteurs trophiques sont une classe de molécules ayant des propriétés de
stimulation de la croissance neuritique ou de la survie des cellules nerveuses. Le
premier facteur possédant des propriétés neurotrophiques, le NGF ("Nerve Growth
Factor"), a été caractérisé il y a une quarantaine d'années (pour revue, voir Levi-
25 Montalcini et Angelletti, *Physiol. Rev.* 48 (1968) 534). D'autres facteurs
neurotrophiques ont été identifiés, et notamment les facteurs de croissance des
fibroblastes (FGF). Les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) dont les formes
acides et basiques ont été identifiées, subissent un transport rétrograde dans plusieurs
population neuronales dont le système nigro-strié (Fergusson et Johnson, 1991J. *Comp.*
30 *Neurol.* 313:693) et permettent in vitro la survie de neurones dopaminergique du
mésencéphale (Knüsel et al, 1990, *J. Neurosci.* 10, 558). Les formes majoritaires de
bFGF humains possèdent respectivement des poids moléculaires de 22,5 kd, 21 kd et
18 kd. (Prats H., Kagahd M., Parts A.C., Klagsbrun M., Lelias J.M., Liauzun P.,

Chalon P., Tauber J.P., Amalric F., Smith J.A. and Caput D.. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 1836-1840 (1989)).

Les facteurs de croissances des fibroblastes humains, sous leur forme basique, (bFGF) sont notamment préconisés pour prévenir et/ou traiter les rétinopathies 5 héréditaires ou acquises, de caractère dégénératif . De même, ils peuvent restaurer une morphologie normale des photorécepteurs.

Pour ce faire, les bFGF sont classiquement injectés directement par voie intravitréenne ou sous rétinienne au niveau du site à traiter. Toutefois, cette forme d'administration n'est pas totalement satisfaisante. En effet, compte-tenu du caractère 10 tumorigène des bFGF, il importe de maîtriser leur localisation essentiellement au niveau de la région désirée de l'organisme. L'injection par voie générale ne peut prévenir de manière sûre la diffusion des bFGF au sein de la circulation sanguine.

La présente invention a notamment pour objectif de proposer une solution particulièrement avantageuse à ce problème.

15 La présente invention réside dans la mise au point de vecteurs particulièrement efficaces pour délivrer in vivo et de manière localisée des quantités thérapeutiquement actives de bFGF et donc permettant de s'affranchir d'effets secondaires indésirables.

La présente invention est particulièrement avantageuse pour l'application de 20 bFGF à titre d'agent thérapeutique.

Plus précisément, la présente invention vise la mise au point de vecteurs particulièrement efficaces pour délivrer in vivo et de manière localisée, des quantités thérapeutiquement actives du gène spécifique codant pour le bFGF dans le système nerveux.

25 Dans la demande copendante n° PCT/EP93/02519, il a été montré que les adénovirus pouvaient être utilisés comme vecteur pour le transfert d'un gène étranger in vivo dans le système nerveux et l'expression de la protéine correspondante.

La présente invention concerne plus particulièrement des constructions nouvelles, particulièrement adaptées et efficaces pour le transfert des facteurs de 30 croissance des fibroblastes basiques (bFGF).

Plus précisément, elle se rapporte à un adénovirus recombinant comprenant une séquence d'ADN codant pour le bFGF ou un de ses dérivés, sa préparation, et son utilisation pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives.

La demanderesse a ainsi mis en évidence qu'il est possible de construire des adénovirus recombinants contenant une séquence codant pour le bFGF, d'administrer ces adénovirus recombinants in vivo, et que cette administration permet une expression stable et localisée de quantités thérapeutiquement actives de bFGF in vivo, dans le système nerveux et en particulier dans le traitement des rétinopathies et sans effet cytopathologique.

Un premier objet de l'invention réside donc dans un adénovirus recombinant défectif comprenant au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou une partie active du facteur de croissance des fibroblastes basiques (bFGF) ou d'un de ses dérivés.

Le facteur de croissance des fibroblastes basiques (bFGF) produit dans le cadre de la présente invention peut être le bFGF humain ou un bFGF animal. Il peut en particulier s'agir de celui du rat.

La séquence d'ADN codant pour le bFGF, utilisée dans le cadre de la présente invention peut être un ADNc, un ADN génomique (ADNg), ou une construction hybride consistant par exemple en un ADNc dans lequel seraient insérés un ou plusieurs introns. Il peut également s'agir de séquences synthétiques ou semisynthétiques.

De manière particulièrement avantageuse, on utilise un ADNc ou un ADNg.

Selon un mode préféré de l'invention, il s'agit une séquence d'ADNg codant pour le bFGF. Son utilisation peut permettre une meilleure expression dans les cellules humaines.

Bien entendu, préalablement à son incorporation dans un vecteur adénovirus selon l'invention, la séquence d'ADN est avantageusement modifiée, par exemple par mutagenèse dirigée, en particulier pour l'insertion de sites de restriction appropriés. Les séquences décrites dans l'art antérieur ne sont en effet pas construites pour une utilisation selon l'invention, et des adaptations préalables peuvent s'avérer nécessaires, pour obtenir des expressions importantes.

Au sens de la présente invention, on entend par dérivé du bFGF, toute séquence obtenue par modification et codant pour un produit conservant l'une au moins des propriétés biologiques du bFGF (effet trophique et/ou différenciateur). Par modification, on doit entendre toute mutation, substitution, délétion, addition ou

modification de nature génétique et/ou chimique. Ces modifications peuvent être réalisées par les techniques connues de l'homme du métier (voir techniques générales de biologie moléculaire ci-après). Les dérivés au sens de l'invention peuvent également être obtenus par hybridation à partir de banques d'acides nucléiques, en utilisant
5 comme sonde la séquence native ou un fragment de celle-ci.

Ces dérivés sont notamment des molécules ayant une plus grande affinité pour leurs sites de fixation, des séquences permettant une expression améliorée in vivo, des molécules présentant une plus grande résistance aux protéases, des molécules ayant une efficacité thérapeutique plus grande ou des effets secondaires moindres, ou
10 éventuellement de nouvelles propriétés biologiques.

Parmi les dérivés préférés, on peut citer plus particulièrement les variants naturels, les molécules dans lesquelles un ou plusieurs résidus ont été substitués, les dérivés obtenus par délétion de régions n'intervenant pas ou peu dans l'interaction avec les sites de liaison considérés ou exprimant une activité indésirable, et les dérivés
15 comportant par rapport à la séquence native des résidus supplémentaires, tels que par exemple un signal de sécrétion et/ou un peptide de jonction.

Selon un mode de réalisation privilégié de l'invention, la séquence d'ADN, codant pour le bFGF ou l'un de ses dérivés, intègre également un signal de sécrétion permettant de diriger le bFGF synthétisé dans les voies de sécrétion des cellules infectées. De cette manière, le bFGF synthétisé est avantageusement libéré dans les
20 compartiments extracellulaires et peut ainsi activer ses récepteurs. Toutefois, il peut également s'agir d'un signal de sécrétion hétérologue ou même artificiel. Dans la mesure du possible, le signal de sécrétion est avantageusement le propre signal du bFGF. Ce sera notamment le cas pour le bFGF de rat qui dispose de son propre peptide signal. En revanche, le bFGF humain n'en dispose pas.
25

La séquence d'ADN, codant pour tout ou partie du bFGF ou d'un de ses dérivés, peut également être une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression du bFGF. Préférentiellement, la séquence d'ADN hétérologue comporte un gène codant pour un ARN antisens capable de contrôler la
30 traduction de l'ARNm du bFGF. La séquence antisens peut être tout ou seulement une partie de la séquence d'ADN, codant pour le bFGF, insérée dans l'orientation inverse dans le vecteur selon l'invention.

Avantageusement, la séquence codant pour le bFGF est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules nerveuses dont en

particulier les cellules rétiniennes. Préférentiellement, il s'agit de signaux d'expression hétérologues, c'est-à-dire de signaux différents de ceux naturellement responsables de l'expression du bFGF. Il peut s'agir en particulier de séquences responsables de l'expression d'autres protéines, ou de séquences synthétiques. Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs E1A, MLP, CMV, LTR-RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique. Il peut en effet être particulièrement intéressant d'utiliser des signaux d'expression actifs spécifiquement ou majoritairement dans les cellules nerveuses, de manière à ce que la séquence d'ADN ne soit exprimée et ne produise son effet que lorsque le virus a effectivement infecté une cellule nerveuse. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs de l'énolase neurone-spécifique, de la GFAP, et plus particulièrement ceux de la rodopsine et de la tyrosinase.

Dans un premier mode de réalisation particulier, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour le facteur de croissance des fibroblastes basiques humain (hbFGF) sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.

L'invention se rapporte également à un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour le facteur de croissance des fibroblastes basiques humain (hbFGF) sous le contrôle du promoteur de la rhodopsine ou de la tyrosinase ainsi qu'à un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour le facteur de croissance des fibroblastes basiques du rat (bFGF) sous le contrôle du promoteur de la rhodopsine ou de la tyrosinase.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNg codant pour le facteur de croissance des fibroblastes basiques (bFGF) sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.

La demanderesse a en effet montré que le promoteur LTR du virus du sarcome de rous (RSV) permettait une expression durable et importante du bFGF dans les cellules du système nerveux, notamment central.

Toujours dans un mode préféré, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique bFGF sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans le système nerveux.

- 5 Un mode particulièrement préféré de mise en oeuvre de la présente invention réside dans un adénovirus recombinant défectif comprenant les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, une séquence d'ADN codant pour le facteur de croissance des fibroblastes basiques (bFGF) ou un dérivé de celui-ci sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans le système nerveux, et dans
10 lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 est non fonctionnel.

- Les adénovirus défectifs selon l'invention sont des adénovirus incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des adénovirus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée.
15 Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par la séquence d'ADN codant pour le bFGF.

- Préférentiellement, le virus défectif de l'invention conserve les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales. Encore plus
20 préférentiellement, comme indiqué ci-avant, le génome du virus recombinant défectif selon l'invention comprend les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, le gène E1 non fonctionnel et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 non fonctionnel.

- Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés
25 varient quelque peu. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande FR 93 05954). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology
30 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(ALS), de la maladie d'Huntington, de l'épilepsie, de la démence vasculaire et également des rétinopathies.

En ce qui concerne plus particulièrement les rétinopathies, il peut s'agir de toute dégénérescence rétinienne, centrale, périphérique ou mixte, ainsi que toute
5 rétinopathie, acquise ou non, et en particulier les rétinopathies diabétiques.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits précédemment. Ces compositions pharmaceutiques peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse,
10 intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe dans le système nerveux du patient. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par
15 addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. L'injection directe dans le système nerveux du patient est avantageuse car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés. L'injection directe dans le système nerveux central du patient est avantageusement réalisée au moyen d'un appareil d'injection stéréotaxique. L'emploi
20 d'un tel appareil permet en effet de cibler avec une grande précision le site d'injection.

A cet égard, l'invention concerne également une méthode de traitement des maladies neurodégénératives comprenant l'administration à un patient d'un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant. Plus particulièrement, l'invention concerne une
25 méthode de traitement des maladies neurodégénératives comprenant l'administration stéréotaxique d'un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant.

Les doses d'adénovirus recombinant défectif utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont
30 formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, puis mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages

de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

Un autre objet de l'invention concerne toute cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits ci-dessus. Plus particulièrement, l'invention concerne toute population de cellules humaines infectée par ces adénovirus. Il peut s'agir en particulier de fibroblastes, myoblastes, hépatocytes, kératinocytes, cellules endothéliales, cellules Gliales, etc.

Les cellules selon l'invention peuvent être issues de cultures primaires. Celles-ci peuvent être prélevées par toute technique connue de l'homme du métier, puis mises en culture dans des conditions permettant leur prolifération. S'agissant plus particulièrement de fibroblastes, ceux-ci peuvent être aisément obtenus à partir de biopsies, par exemple selon la technique décrite par Ham [Methods Cell.Biol. 21a (1980) 255]. Ces cellules peuvent être utilisées directement pour l'infection par les adénovirus, ou conservées, par exemple par congélation, pour l'établissement de banques autologues, en vue d'une utilisation ultérieure. Les cellules selon l'invention peuvent également être des cultures secondaires, obtenues par exemple à partir de banques préétablies.

Les cellules en culture sont ensuite infectées par des adénovirus recombinants, pour leur conférer la capacité de produire du bFGF. L'infection est réalisée in vitro selon des techniques connues de l'homme du métier. En particulier, selon le type de cellules utilisé et le nombre de copies de virus par cellule désiré, l'homme du métier peut adapter la multiplicité d'infection et éventuellement le nombre de cycles d'infection réalisé. Il est bien entendu que ces étapes doivent être effectuées dans des conditions de stérilité appropriées lorsque les cellules sont destinées à une administration in vivo. Les doses d'adénovirus recombinant utilisées pour l'infection des cellules peuvent être adaptées par l'homme du métier selon le but recherché. Les conditions décrites ci-avant pour l'administration in vivo peuvent être appliquées à l'infection in vitro.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant une quantité suffisante de virus recombinant défectif tel que décrit précédemment.

Selon un mode de réalisation privilégié de l'invention, ces compositions sont tout particulièrement adaptées à un traitement des rétinoopathies.

En particulier, le virus recombinant défectif peut être sous forme de solution injectable, de collyre, de pommade ophtalmique, etc. Les véhicules pharmaceutiquement acceptables pour de telles formulations adaptées à un usage oculaire sont notamment des solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), la vaseline, l'huile de vaseline, etc.

Dans le cas de collyres ou de pommades ophtalmiques, il est entendu que les applications thérapeutiques peuvent être plus limitées en raison d'une diffusion plus faible du virus recombinant défectif.

Dans leur utilisation pour le traitement des pathologies oculaires, les virus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être administrés selon différents modes, et notamment par injection sous-rétinale, éventuellement précédée d'une vitrectomie, ou par injection intravitréuse, simples ou multiples. L'injection sous-rétinale peut être réalisée sélectivement dans différents compartiments de l'oeil, et notamment, l'injection peut être réalisée au niveau du vitré, de la chambre antérieure ou de l'espace rétrobulbaire. Ces différents modes d'injection permettent d'infecter de manière ciblée les différents tissus de l'oeil, et notamment, l'endothélium cornéen, les cellules photoréceptrices, les cellules bipolaires, les cellules ganglionnaires ou encore les cellules des muscles oculomoteurs.

Un autre objet de l'invention concerne un implant comprenant des cellules mammifère infectées par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs telles que décrites ci-dessus, et une matrice extracellulaire. Préférentiellement, les implants selon l'invention comprennent 10^5 à 10^{10} cellules. Plus préférentiellement, ils en comprennent 10^6 à 10^8 .

Plus particulièrement, dans les implants de l'invention, la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant et éventuellement un support permettant l'ancrage des cellules.

Pour la préparation des implants selon l'invention, différents types de gélifiants peuvent être employés. Les gélifiants sont utilisés pour l'inclusion des cellules dans une matrice ayant la constitution d'un gel, et pour favoriser l'ancrage des cellules sur le support, le cas échéant. Différents agents d'adhésion cellulaire peuvent donc être utilisés comme gélifiants, tels que notamment le collagène, la gélatine, les glycosaminoglycans, la fibronectine, les lectines, etc. De préférence, on utilise dans le

cadre de la présente invention du collagène. Il peut s'agir de collagène d'origine humaine, bovine ou murine. Plus préférentiellement, on utilise du collagène de type I.

Comme indiqué ci-avant, les compositions selon l'invention comprennent avantageusement un support permettant l'ancrage des cellules. Le terme ancrage désigne toute forme d'interaction biologique et/ou chimique et/ou physique entraînant l'adhésion et/ou la fixation des cellules sur le support. Par ailleurs, les cellules peuvent soit recouvrir le support utilisé, soit pénétrer à l'intérieur de ce support, soit les deux. On préfère utiliser dans le cadre de l'invention un support solide, non toxique et/ou bio-compatible. En particulier, on peut utiliser des fibres de polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou un support d'origine biologique.

Les implants selon l'invention peuvent être implantés en différents sites de l'organisme. En particulier, l'implantation peut être effectuée au niveau de la cavité péritonéale, dans le tissu sous-cutané (région sus-pubienne, fosses iliaques ou inguinales, etc), dans un organe, un muscle, une tumeur, le système nerveux central, ou encore sous une muqueuse. Les implants selon l'invention sont particulièrement avantageux en ce sens qu'ils permettent de contrôler la libération du produit thérapeutique dans l'organisme : Celle-ci est tout d'abord déterminée par la multiplicité d'infection et par le nombre de cellules implantées. Ensuite, la libération peut être contrôlée soit par le retrait de l'implant, ce qui arrête définitivement le traitement, soit par l'utilisation de systèmes d'expression régulable, permettant d'induire ou de réprimer l'expression des gènes thérapeutiques.

La présente invention offre ainsi un moyen très efficace pour le traitement ou la prévention des maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, et de l'ALS mais également les rétinopathies. Les vecteurs adénoviraux selon l'invention présentent en outre des avantages importants, liés notamment à leur très haute efficacité d'infection des cellules nerveuses, permettant de réaliser des infections à partir de faibles volumes de suspension virale. De plus, l'infection par les adénovirus de l'invention est très localisée au site d'injection, ce qui évite les risques de diffusion aux structures cérébrales voisines.

En outre, ce traitement peut concerner aussi bien l'homme que tout animal tel que les ovins, les bovins, les murins, les animaux domestiques (chiens, chats, etc), les chevaux, les poissons, etc.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

Figure 1 : Représentation du vecteur pLTR IX-hbFGF

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. **13** (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science **230** (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. **155** (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Exemples

5 **Exemple 1 : Construction du vecteur pLTR IX-rbFGF.**

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur comprenant une séquence d'ADN codant pour le bFGF de rat sous le contrôle d'un promoteur constitué par le LTR du RSV.

10 1.1. Vecteur de départ (pLTR IX) : Le vecteur pLTR IX contient en particulier la région gauche de l'adénovirus Ad5 comprenant l'LTR et le site d'encapsulation, le promoteur LTR de RSV, et une région de l'adénovirus Ad5 allant du gène pIX jusqu'au site de restriction EagI, permettant la recombinaison homologue in vivo. Ce vecteur a été décrit par Stratford-Perricaudet et al. (J. Clin. Invest. 90 (1992) 626).

15 1.2. Construction d'une séquence ADNc codant pour le rbFGF.

Pour permettre la réalisation de vecteurs selon l'invention, une séquence d'ADNc codant pour le bFGF de rat est construite comme suit :

20 Un fragment de 820 paires de base contenant la séquence codante du bFGF de rat et son propre peptide signal a été isolé à partir du plasmide pUC13-bFGF par digestion par l'enzyme EcoRI. Ce fragment a ensuite été sous-cloné au site correspondant du vecteur Bluescript (Pharmacia).

1.3. Construction du vecteur pLTR IX -rbFGF

25 Cet exemple décrit la construction du vecteur pLTR IX-bFGF contenant la séquence codant pour le bFGF de rat (Shimasaki S., Emoto N., Koba A., Mercado M., Shibata F., Cooksey K., Baird A. and Lin N. Complementary DNA cloning and sequencing of the rat ovarian basic fibroblasts growth factor and tissue distribution study of its mRNA, B.B.R.C. 157, 256-263, 1988) sous contrôle du LTR du virus RSV, ainsi que des séquences de l'adénovirus Ad5 permettant la recombinaison in vivo.

30 Le fragment DraII-SacII a été isolé par digestion enzymatique à partir de la construction préparée dans l'exemple 1.2. Ce fragment contient la séquence codante du bFGF. Ce fragment a été isolé et purifié par électrophorèse sur un gel d'agarose LMP

("Low Melting Point"), puis traité par l'ADN polymérase de T4 pour obtenir des extrémités franches. Ce fragment a ensuite été inséré au site EcoRV du vecteur pLTR IX (exemple 1.1.) pour générer le vecteur pLTR IX-rbFGF. L'ensemble de la séquence nucléotidique de l'insert rbFGF a ensuite été vérifiée par séquençage didéoxynucléotides.

Exemple 2: Construction du vecteur pLTR IX-hbFGF.

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur comprenant une séquence d'ADN codant pour le bFGF humain sous le contrôle d'un promoteur constitué par le LTR du RSV.

Un fragment de 1,63 kb, codant pour le bFGF humain, a été isolé du plasmide pSCT40 par digestion enzymatique au niveau des sites XhoI et EcoRV. Ce fragment a ensuite été inséré au niveau des sites Sall (1028) et EcoRV(1119) du vecteur pLTR IX (exemple 1.1.) pour générer le vecteur pLTR IX-hbFGF (figure 1). L'ensemble de la séquence nucléotidique de l'insert bFGF a ensuite été vérifiée par séquençage didéoxynucléotides.

Exemple 3. Construction des adénovirus recombinants contenant une séquence codant pour le BFGF humain.

Le vecteur pLTR IX-bFGF a été linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en trans les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Plus précisément, l'adénovirus Ad-bFGF a été obtenu par recombinaison homologue in vivo entre l'adénovirus mutant Ad-dl1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le vecteur pLTR IX-bFGF, selon le protocole suivant : le plasmide pLTR IX-bFGF et l'adénovirus Ad-dl1324, linéarisé par l'enzyme ClaI, ont été cotransfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés ont été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant a été amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus déficient recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient.

REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif comprenant au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou une partie active du bFGF ou d'un de ses dérivés.
 2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNc.
-
3. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNg
 4. Adénovirus selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour le bFGF humain.
 - 10 5. Adénovirus selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour le bFGF du rat.
 6. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence antisens dont l'expression permet de contrôler l'expression du gène bFGF.
 - 15 7. Adénovirus selon la revendication 6 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un gène codant pour un ARN antisens capable de contrôler la traduction de l'ARNm du bFGF.
 8. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules nerveuses.
 - 20 9. Adénovirus selon la revendication 8 caractérisé en ce que les signaux d'expression sont choisis parmi les promoteurs viraux, de préférence parmi les promoteurs E1A, MLP, CMV et LTR-RSV.
 10. Adénovirus selon la revendication 1 comprenant une séquence d'ADNg codant pour le bFGF humain sous le contrôle d'un promoteur LTR-RSV.
 - 25 11. Adénovirus selon la revendication 1 comprenant une séquence d'ADN codant pour tout ou une partie active du facteur de croissance des fibroblastes basiques (bFGF) ou d'un dérivé de celui-ci sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans les cellules nerveuses.

12. Adénovirus selon la revendication 11 caractérisé en ce que le promoteur est choisi parmi le promoteur de l'énolase neurone spécifique et le promoteur de la GFAP et de préférence parmi les promoteurs de la rhodopsine et de la tyrosinase.

13. Adénovirus selon la revendication 1 comprenant une séquence d'ADNc
5 codant pour le bFGF humain sous le contrôle d'un promoteur de la rhodopsine ou de la tyrosinase.

14. Adénovirus selon la revendication 1 comprenant une séquence d'ADNc codant pour le bFGF du rat sous le contrôle d'un promoteur de la rhodopsine ou de la tyrosinase.

10 15. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 14 caractérisé en ce qu'il est dépourvu des régions de son génome qui sont nécessaires à sa réplication dans la cellule cible.

16. Adénovirus selon la revendication 15 caractérisé en ce qu'il comprend les ITR et une séquence permettant l'encapsidation, et dans lequel le gène E1 et au moins
15 un des gènes E2, E4, L1-L5 sont non fonctionnels.

17. Adénovirus selon la revendication 15 ou 16 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus humain de type Ad 2 ou Ad 5 ou canin de type CAV-2.

18. Utilisation d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 17 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la
20 prévention des maladies neurodégénératives.

19. Utilisation selon la revendication 18 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention de la maladie de Parkinson, d'Alzheimer, de Huntington ou de l'ALS.

20. Utilisation selon la revendication 19 pour la préparation d'une
25 composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des rétinopathies.

21. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 17.

22. Composition pharmaceutique selon la revendication 21 caractérisée en ce qu'elle est sous forme injectable.

23. Composition pharmaceutique selon la revendication 21 caractérisée en ce qu'elle est sous forme une forme adaptée à un usage oculaire.

5 24. Composition pharmaceutique selon la revendication 23 caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité suffisante d'adénovirus recombinant défectif sous une forme de collyre ou de pommade ophtalmique adaptée à un usage oculaire.

25. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 21 à 24 caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10 10^{10} pfu/ml adénovirus recombinants défectifs.

26. Cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 17.

27. Cellule selon la revendication 26 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine.

15 28. Cellule selon la revendication 27 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine de type rétinienne, fibroblaste, myoblaste, hépatocyte, cellule endothéliale, cellule Gliales ou kératynocyte.

29. Implant comprenant des cellules infectées selon les revendications 26 à 28 et une matrice extracellulaire.

20 30. Implant selon la revendication 29 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant choisi de préférence parmi le collagène, la gélatine, les glucosaminoglycans, la fibronectine et les lectines.

31. Implant selon les revendications 29 ou 30 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend également un support permettant l'ancrage des cellules 25 infectées.

32. Implant selon la revendication 31 caractérisé en ce que le support est constitué préférentiellement par des fibres de polytétrafluoroéthylène.

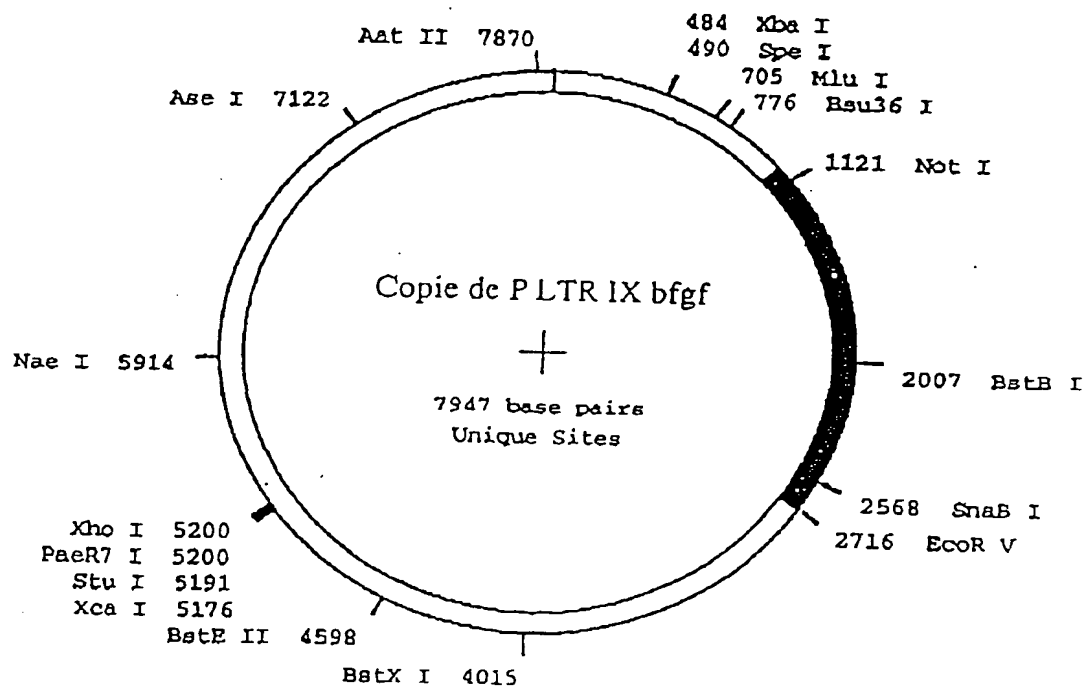


Figure 1

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/00374

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/86 A61K48/00 C07K14/50 C12N15/12		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SCIENCE, vol.259, 12 February 1993, LANCASTER, PA US pages 988 - 990 LE GAL LA SALLE, G. 'An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain' see the whole document --- -/--	1-26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 1 June 1995		Date of mailing of the international search report 19.06.1995
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/00374

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NOUVELLE REVUE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE, vol.35, no.3, 1993 pages 299 - 300 PESCHANSKI, M. ET AL. 'Transfert de gènes à but thérapeutique dans le système nerveux central' see the whole document	1-32
O,Y	& XIIth congrès de la société française d'hématologie, Strasbourg, France 1-3 June 1993 ---	1-32
Y	INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY AND VISUAL SCIENCE, vol.34, no.3, March 1993 pages 473 - 476 BOK, D. 'Retinal transplantation and gene therapy' see page 474, line 1, paragraph 2 ---	1-32
Y	NEUROREPORT, vol.5, no.7, 21 March 1994 pages 801 - 804 RIDOUX, V. ET AL. 'The use of adenovirus vectors for intracerebral grafting of transfected nervous cells' see the whole document ---	1-32
Y	WO,A,93 08828 (GEN. HOSP. CORPORATION & SYNTEX-SYNERGEN NEUROSCIENCE JOINT VENTURE) 13 May 1993 see the whole document ---	1-32
Y	FR,A,2 688 514 (CNRS) 17 September 1993 see claims ---	1-32
P,Y	WO,A,94 08026 (CNRS) 14 April 1994 see the whole document ---	1-32
A	EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol.208, no.2, September 1992, AMSTERDAM NL pages 211 - 225 ROEMER, K. & FRIEDMANN, T. 'Concepts and strategies for human gene therapy' see page 218, column 2, paragraph 3 - page 219, column 1, paragraph 1 ---	1
P,Y	WO,A,94 20146 (RHONE-POULENC RORER S.A. ET AL.) 15 September 1994 see the whole document ---	1
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/00374

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MEDECINE /SCIENCES, vol.9, no.2, February 1993 pages 208 - 210 DANOS, O. ET AL. 'Réimplantation de cellules génétiquement modifiées dans des néo-organes vascularisés' see the whole document ---	1
A	BRAIN RESEARCH, vol.648, no.1, 1994 pages 171 - 175 RIDOUX, V. ET AL. 'Adenoviral vectors as functional retrograde neuronal tracers' see the whole document ---	1
A	SCIENCE, vol.256, no.5063, 12 June 1992, LANCASTER, PA US pages 1550 - 1552 CULVER, K. W. ET AL. 'In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors' see the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
information on patent family members

Inter-
nal Application No
PCT/FR 95/00374

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9308828	13-05-93	AU-A- 3129793	07-06-93
FR-A-2688514	17-09-93	AU-B- 3757093	21-10-93
		CA-A- 2102302	17-09-93
		EP-A- 0593755	27-04-94
		WO-A- 9319191	30-09-93
		HU-A- 66486	28-11-94
		JP-T- 6508039	14-09-94
		NO-A- 934061	09-11-93
WO-A-9408026	14-04-94	AU-B- 4818093	26-04-94
		NO-A- 951121	23-03-95
WO-A-9420146	15-09-94	FR-A- 2702152	09-09-94
		AU-B- 6144494	26-09-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demr internationale No
PC1/FR 95/00374

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/86 A61K48/00 C07K14/50 C12N15/12		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 A61K C07K C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	SCIENCE, vol.259, 12 Février 1993, LANCASTER, PA US pages 988 - 990 LE GAL LA SALLE, G. 'An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain' voir le document en entier --- -/--	1-26
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *&* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 1 Juin 1995		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 19-06-1995
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Chambonnet, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dern. Internationale No
PCT/FR 95/00374

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	NOUVELLE REVUE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE, vol.35, no.3, 1993 pages 299 - 300 PESCHANSKI, M. ET AL. 'Transfert de gènes à but thérapeutique dans le système nerveux central' voir le document en entier	1-32
O,Y	& XIIth congrès de la société française d'hématologie, Strasbourg, France 1er au 3 Juin 1993 ---	1-32
Y	INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY AND VISUAL SCIENCE, vol.34, no.3, Mars 1993 pages 473 - 476 BOK, D. 'Retinal transplantation and gene therapy' voir page 474, ligne 1, alinéa 2 ---	1-32
Y	NEUROREPORT, vol.5, no.7, 21 Mars 1994 pages 801 - 804 RIDOUX, V. ET AL. 'The use of adenovirus vectors for intracerebral grafting of transfected nervous cells' voir le document en entier ---	1-32
Y	WO,A,93 08828 (GEN. HOSP. CORPORATION & SYNTEX-SYNERGEN NEUROSCIENCE JOINT VENTURE) 13 Mai 1993 voir le document en entier ---	1-32
Y	FR,A,2 688 514 (CNRS) 17 Septembre 1993 voir revendications ---	1-32
P,Y	WO,A,94 08026 (CNRS) 14 Avril 1994 voir le document en entier ---	1-32
A	EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol.208, no.2, Septembre 1992, AMSTERDAM NL pages 211 - 225 ROEMER, K. & FRIEDMANN, T. 'Concepts and strategies for human gene therapy' voir page 218, colonne 2, alinéa 3 - page 219, colonne 1, alinéa 1 ---	1
P,Y	WO,A,94 20146 (RHONE-POULENC RORER S.A. ET AL.) 15 Septembre 1994 voir le document en entier ---	1
-/--		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Desr Internationale No
PCT/FR 95/00374

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	MEDECINE /SCIENCES, vol.9, no.2, Février 1993 pages 208 - 210 DANOS, O. ET AL. 'Réimplantation de cellules génétiquement modifiées dans des néo-organes vascularisés' voir le document en entier ---	1
A	BRAIN RESEARCH, vol.648, no.1, 1994 pages 171 - 175 RIDOUX, V. ET AL. 'Adenoviral vectors as functional retrograde neuronal tracers' voir le document en entier ---	1
A	SCIENCE, vol.256, no.5063, 12 Juin 1992, LANCASTER, PA US pages 1550 - 1552 CULVER, K. W. ET AL. 'In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors' voir le document en entier -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Doc. Internationale No
PCT/FR 95/00374

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9308828	13-05-93	AU-A- 3129793	07-06-93
FR-A-2688514	17-09-93	AU-B- 3757093	21-10-93
		CA-A- 2102302	17-09-93
		EP-A- 0593755	27-04-94
		WO-A- 9319191	30-09-93
		HU-A- 66486	28-11-94
		JP-T- 6508039	14-09-94
		NO-A- 934061	09-11-93
WO-A-9408026	14-04-94	AU-B- 4818093	26-04-94
		NO-A- 951121	23-03-95
WO-A-9420146	15-09-94	FR-A- 2702152	09-09-94
		AU-B- 6144494	26-09-94

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.